

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Kristýna Gottfriedová

Biokompatibilita platformy tvořené diamantovými nanokrystaly s nervovými buňkami.

Biocompatibility of diamond-based platforms with neuronal cells.

Bakalářská práce

Vedoucí práce/Školitel: RNDr. Mgr. Veronika Benson, Ph.D.

Praha, 2018

Poděkování

Cesta k listům papíru, které držíte v rukou, byla hodně dlouhá a náročná. A neprošla bych ji, kdybych neměla okolo sebe lidi, kteří mi ukazovali směr a drželi mapu. Je Vás hodně. Takže to vezmu jmenovitě, děkuji mojí školitelce Verče, která se mnou má trpělivost a akceptovala, že jsem na tom svém výletě měla chvílky, kdy jsem jen tak seděla na kameni u cesty. Děkuji svému příteli Martinovi, on mi držel tu pomyslnou mapu, a když jsem ji roztrhala, vytiskl mi novou. Pak dvěma ženám, které mi dělají horskou službu při cestě životem, děkuji Lenko a Jano. A rodině, která mě k tomu dokopala a řekla, ať už zapnu čelovku a hledám závěr své bakalářské práce i ve chvíli, kdy jsem myslela, že je to nemožné.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 26.7.2018

Abstrakt

Mikroelektrodová pole představují terapeutický přístup v léčbě neuro-degenerativních onemocnění. Vývoj platform pro elektrody je velmi náročný vzhledem k výběru materiálu interagujícího přímo s buňkami nervové tkáně. Nanodiamant je jedním ze zkoumaných materiálů díky svým biochemickým vlastnostem: biokompatibilita s řadou buněčných typů, chemická inertnost a vysoká odolnost proti oděru a korozi. Při vývoji nanodiamantových platform se výzkum v oblasti biologie soustředí na biokompatibilitu použitého materiálu s primárními neurony a také na hodnocení adheze neurálních buněk k nanodiamantu, což je posléze důležité pro dostatečně citlivé snímání elektrické aktivity neuronů. Jak biokompatibilita platformy, tak i míra adheze neuronů záleží na typu použitého nanodiamantu, procesu výroby, drsnosti povrchu a povrchové úpravě. V neposlední řadě je také důležité množství boru, kterým se deponovaný nanodiamant obohatí, aby byl schopný vést elektrické impulzy.

V předkládané práci jsem shrnula hodnocení biokompatibility a adheze nervových buněk vzhledem k výše uvedeným parametrům a diskutuji variabilitu experimentálních výsledků vzhledem k použité povrchové modifikaci a použitému typu buněk. Podle výsledků výzkumu vyplývá, že nejlépe adherují a prosperují neuronální buňky na platformách, které jsou potaženy molekulami extracelulární matrix případně molekulami poly-lysinu, který umožní elektrostatickou interakci neuronů s povrchem.

Klíčová slova

nanodiamant, nervová buňka, biokompatibilita, mikroelektrodové pole

Abstract

Microelectrode arrays represent therapeutic approach to neurodegenerative diseases treatment. The development of electrode platforms is rather challenging due to the direct interaction of the material with neuronal tissue. Nanodiamond is one of the researched materials because of its biochemical properties: biocompatibility with many cell types, chemical inertness, high wear and corrosion resistance. During nanodiamond platforms development, biological research focuses on biocompatibility of used material with primary neurons and the evaluation of their adherence to the nanodiamond that is important for recording of electrical activity of neurons. Both, the biocompatibility as well as the adherence depend on the used nanodiamond, manufacturing, roughness, and surface modification. The amount of boron dopant enabling electric conductivity of nanodiamond is also important.

In my thesis, I have summarized research on biocompatibility and adherence of neural cells on behalf of above mentioned parameters. I discuss here the variability of experimental results in order to surface modification and cultured cells type. According to the research reports, it seems that neuronal cells prosper well and prefer to adhere to platforms covered with molecules of extracellular matrix or at least poly-lysine (enabling electrostatic interaction of neurons with the platform).

Keywords

nanodiamond, neuronal cell, biocompatibility, microelectrode array

Seznam zkratek

Zkratka	Celý název
CAM	buněčné adhezní molekuly
BNCD	borem dopovaný nanokrystalický diamant
CMFDA	5-chloromethylfluorescein diacetát
CNS	centrální nervová soustava
CSPGs	chondroitin sulfát proteoglykan
CVD	depozice z plynné fáze
DLC	karbon podobný diamantu
DND	detonační nanodiamanty
ECM	extracelulární matrix
EGF	epidermální růstový faktor
FGF2	fibroblastový růstový faktor
GAG	glykosaminoglykany
GFAP	kyselé fibrilární protein glií
HG	lidské fibroblasty sliznice dásně
HPHT	vysoká teplota, vysoký tlak
LDH	laktát dehydrogenáza
MEA	mikroelektrodové pole
MTT	3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-difenyltetrazoliumbromid
NCAM	molekuly adheze neurálních buněk
NCD	nanokrystalický diamant
ND	nanodiamant
NSC	neurální kmenové buňky
OMO	homoepitaxiální

PBS	fosfátový pufr
PCD	polykrystalický diamant
PI	propidium iodid
UNCD	ultrananokrystalický diamant

Obsah

Poděkování	2
Abstrakt	4
Klíčová slova	4
Abstract	5
Keywords	5
Seznam zkratk.....	6
Cíl bakalářské práce.....	10
Úvod	1
1. Buňky centrálního nervového systému [CNS]	2
1.1 Neurony.....	2
1.2 Neurální kmenové buňky [NSC].....	3
1.2.1 Původ neurálních kmenových buněk	4
1.2.2 Neurosféry.....	4
1.3 Gliové buňky.....	4
1.4 Bazální ganglia	5
2. Adheze buňka - povrch.....	6
2.1 Extracelulární matrix	6
2.1.1 Extracelulární matrix v CNS	6
2.1.2 Jaké proteiny ECM preferují neuronální buňky.....	8
2.2 Integriny	8
2.3 Tvorba shluků	9
3 Adheze buňka - buňka	10
3.1 Neurální buněčné adhezí molekuly [N-CAM]	10
4 Obecná charakteristika elektrod	12
5 Diamant, hlavní složka elektrodových platform.....	13
5.1 Nanodiamant [ND]	13
5.1.1 Výroba nanodiamantů pro tvorbu platform.....	13
5.1.2 NCD platformy	14
6 Biokompatibilita	20
6.1 Makroskopické znaky napovídající o viabilitě buněk	20
6.2 Měření biokompatibilitu buněk na NCD destičkách	20
7 Hodnocení adheze buněk k NCD	22
8 Studie biokompatibilitu platform z nanokrystalických diamantů.....	23

9	Biokompatibilita platforem z ultra nanokrystalických diamantů [UNCD]	26
10	Biokompatibilita platforem z polykrystalických diamantů [PCD]	27
	Závěr a diskuze	28
	Citovaná literatura.....	30

Cíl bakalářské práce

Cílem této bakalářské práce je zhodnocení kompatibility a adhezivity zejména gliových a nervových buněk s nanodiamantovými povrchy mikroelektrod, které budou využity pro hloubkovou stimulaci mozku u pacientů s Parkinsonovou chorobou.

Úvod

Otázkou posledních let, se stávají neurodegenerativní onemocnění, která postihují populaci středního a vyššího věku. Ačkoli se vyvíjí farmakoterapeutická léčba, neopominutelná je i terapie pomocí mozkových sond, které do budoucna mohou těmto pacientům pomoci.

Parkinsonova choroba je neurodegenerativní onemocnění, které obecně vzato postihuje centrální nervovou soustavu. Primárním projevem této nemoci je pozvolná neschopnost ovládat pohyb těla

Za řízení pohybu jsou z velké části zodpovědná bazální ganglia, která jsou regulována dopaminem. A právě dopaminu je při této chorobě nedostatek, a to z důvodu pozvolné ztráty neuronů v oblasti černé substance [*Substantia nigra*], které dopamin tvoří.

Stav člověka s Parkinsonovou chorobou je proměnlivý a jeho potíže se mohou v určitých fázích dne mírnit. Jedná se o onemocnění, na které v současné době není léčba, která by zaručovala úplné uzdravení, existuje pouze léčba udržovací, která mírní příznaky. Jedná se o aminokyselinu L-dihydroxy-fenylalanin, která funguje jako prekurzor dopaminu, který se v mozku přemění na dopamin. Nevýhoda této léčby je jednak v nutnosti postupně navyšovat dávky léku, vedlejší účinky a také to, že nelze účinek této léčby upravovat dle aktuálních potřeb uživatele. Jinak řečeno, když má pacient fázi, kdy jsou příznaky minimální, nelze utlumit účinek léku.

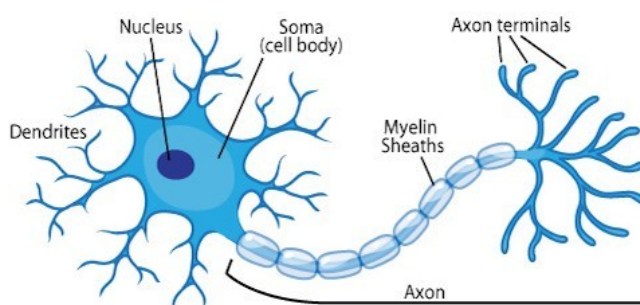
K chirurgickým zákrokům se samozřejmě přistupuje jen v nejkrajnějších případech, kdy nezabírá medikamentózní léčba. Jednou z chirurgických možností léčby je zavedení elektrod do mozku. Tyto elektrody pak mají tu schopnost, že stimulují bazální ganglia v centrálním nervovém systému.

1. Buňky centrálního nervového systému [CNS]

Jak vyplývá z předešlého textu, platformy (elektrody) jsou určené pro intracerebrální využití. Setkávají se tedy bezprostředně s nervovou tkání bazálních ganglií. Pro lepší pochopení následujících kapitol, zde uvádím stručné charakteristiky jednotlivých buněčných typů vyskytujících se v těchto oblastech.

1.1 Neurony

Při testování elektrod pro hloubkovou stimulaci mozku, je největší důraz kladen na neurony. Protože právě s neurony by platformy měly být primárně ve spojení. Zjednodušené schéma neuronu je na obrázku 1 [Obrázek 1 (1)]. Neurony jsou plně diferencované buňky, které již nemají schopnost proliferace. Tyto buňky se skládají z těla, které se také nazývá *soma*, dále z dendritů, které vedou signál směrem do buňky a axonů, které vedou signál z buňky, někdy se pro ně využívá označení neurity.

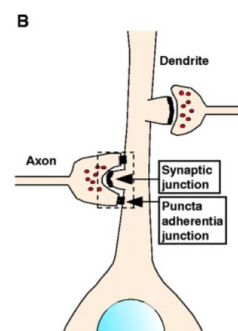


Obrázek 1

Schematické znázornění neuronu centrální nervové soustavy (1).

Výše zmíněné dendrity se větví do dendritických trnů, které přijímají postsynaptický signál. Axony mají na svém začátku tzv. axonový hrbolek, kterým je axon propojen s tělem neuronu. V tomto místě vzniká akční potenciál, který se axonem vede k efektorové jednotce – ať už je to jiný neuron nebo svalová buňka. Axony mají po téměř celé délce gliové buňky, které tvoří Schwannovy pochvy. Schwannovy pochvy jsou zásadní pro rychlé vedení vzruchu, ale přesto se u některých neuronů přirozeně nevyskytují.

Jednotlivé neurony jsou propojeny pomocí speciálních mezibuněčných spojů, kterým se říká synapse. Synapse se utváří spojením axonu a dendritického trnu, kdy počáteční interakce axonu a dendritu navodí signalizaci na základě, které se začnou specializovat membrány v tvořící se synapsi a začne se spojení upevňovat (2). Synapse je držena pospolu díky dvěma typům adhezních struktur. Jsou to synaptické spoje a bodové adhezní spoje [puncta adherentia junctions] (2), oba dva typy těchto spojů jsou znázorněné na obrázku 2 [Obrázek 2 (3)]. Synaptický spoj je spojen s presynaptickou zónou axonu, kde je uloženo mnoho váčků obsahujících neurotransmitery. Presynaptická zóna je také bohatá na vápníkové kanály (2). Postsynaptická zóna dendritu naopak obsahuje v membráně receptory pro neurotransmitery.



Obrázek 2

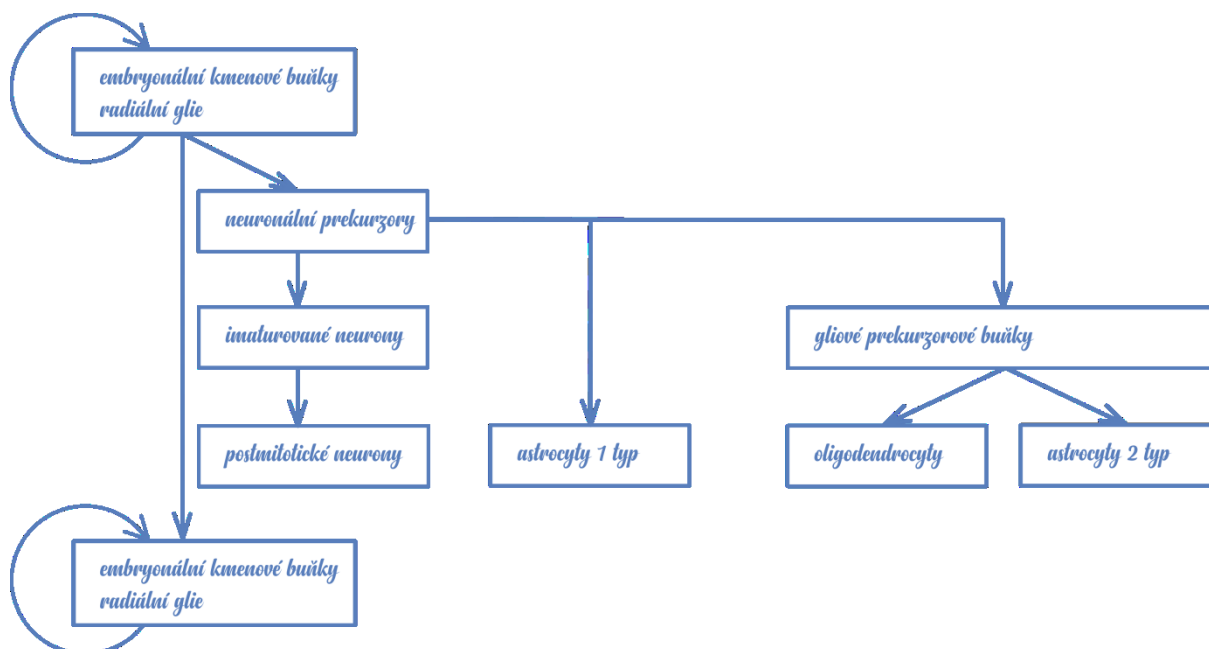
Schematické znázornění synaptického spoje a bodového adhezního spoje (3).

1.2 Neurální kmenové buňky [NSC]

Při vývoji a testování nanodiamantových platforem *in vitro* se většinou využívá neurálních kmenových buněk.

Neurální kmenové buňky jsou nediferencované sebeobnovující se a tripotentní. Mají schopnost dát vznik neuronům, astrocytům a oligodendrocytům, jsou tedy schopné asymetrického dělení. Mohou se také dělit symetricky, kdy z jedné kmenové buňky vzniknou dvě buňky kmenové. Pro lepší přehlednost je proliferace zobrazená na obrázku 3 [Obrázek 3 (4)].

Diferenciace z neurálních kmenových buněk probíhá zejména během embryonální fáze a v malém množství i během následujícího života. Neurální kmenové buňky jsou většinu času následujícího po embryonální fázi v takzvané spící formě (5). V případě lokálního poranění jsou schopné proliferace a následné diferenciace.



Obrázek 3

Schéma proliferace a diferenciace neurálních kmenových buněk (4).

In vivo tyto buňky s vysokou pravděpodobností s elektrodou ve styku nebudou, ale používají se z toho důvodu, že tyto buňky je snazší kultivovat. Neurální kmenové buňky byly také využívány jako testovací kultura, ze které byla indukována diferenciace do neuronů a gliových buněk, které se po implantaci integrovaly do hostitelské tkáně (6).

1.2.1 *Původ neurálních kmenových buněk*

Pro účel výzkumu biokompatibility nanodiamantových platform se získávají neurální kmenové buňky z fetálního nebo dospělého myšího centrálního nervového systému a následně se kultivují.

U vyvíjejícího se mozku se kmenové buňky nacházejí v takzvané ventrikulární zóně (5). V mozku, který je již vyvinutý vznikají nové neurální kmenové buňky v oblasti vroubkového závitu [*gyrus dentatus*] v hipokampu a v subventrikulární zóně, která se táhne podél první a druhé komory mozkové. Právě z vroubkového závitu dochází k obnově nervové tkáně například při neurodegenerativních onemocněních u hlodavců, buňky z něj migrují k místu poranění (7). V případě kultury hlodavčích neurálních kmenových buněk pocházejících ze subventrikulární zóny dospělého jedince, je pro jejich úspěšné pasážování a udržení jejich schopnosti sebeobnovy je nutné do média přidávat buď epidermální růstový faktor [FGF] anebo fibroblastový růstový faktor [FGF2]. Na diferenciaci neurálních kmenových buněk do astrocytů se významně podílí glykoprotein GP130 někdy v literatuře označovaný jako CD130.

Zásadní nedostatek výzkumů používajících neurální kmenové buňky je, že většina neurodegenerativních onemocnění se projevuje u starších jedinců, u kterých se vlivem stárnutí snižuje schopnost neurogeneze v této oblasti a tudíž i schopnost obnovy postižené tkáně (8).

1.2.2 *Neurosféry*

V odborné literatuře se zmiňují i takzvané neurosféry. Jedná se o neurální kmenové buňky, které *in vitro* rostou ve sférovitých útvech, které se vznášejí. Tento typ buněčných uskupení se ale *in vivo* nevyskytuje. U buněk, které jsou schopné neurosféry tvořit se prokázala produkce GFAP (9), který se v rámci centrálního nervového systému vyskytuje v astroglích (10).

1.3 *Gliové buňky*

Při testování biokompatibility NCD elektrod, jsou v kulturách také gliové buňky. Podstatné ale je, aby po nasazení *in vitro* na platformu gliové buňky nepřerůstaly neuronální buňky, které nemají schopnost proliferace.

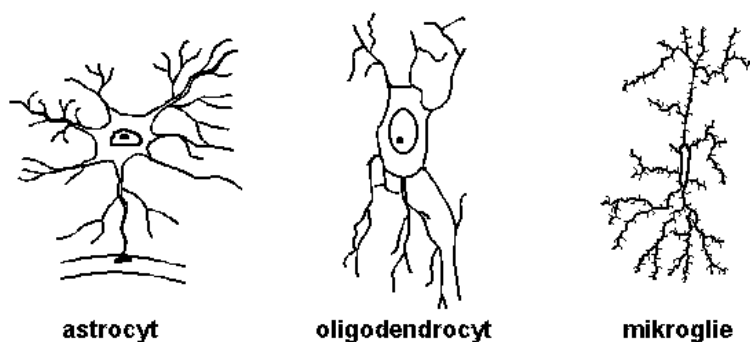
Gliové buňky jsou několika typů, a jsou zobrazené na obrázku 4 [Obrázek 4 (11)]. Jedná se o mikroglie, astrocyty a oligodendocyty. Gliové buňky jsou schopné pouze velmi pomalé proliferace.

Mikroglie jsou velmi pohyblivé buňky a mají schopnost fagocytózy.

Astrocyty, které se také jinak nazývají makroglie, mají hvězdovitý tvar a mají schopnost vychytávat neurotransmitery ze synaptické štěrby (2). Tento typ gliových buněk je také důležitý při utváření synapsí (2). Astrocytů jsou minimálně tři typy a to vláknité, které jsou lokalizované v bílé hmotě, protoplazmatické, které jsou v šedé hmotě (12) a radiální glie. Ačkoliv radiální glie mají na svém

povrchu receptory pro neuropřenašeče, metabotropní receptory a iontové kanály nevytváří akční potenciály (13).

Oligodendrocyty jsou velikostně mezi astrocyty a mikroglie a obalují axony neuronů v centrální nervové soustavě. Jejich výběžky jsou spíše kratší.



Obrázek 4

Tři typy gliových buněk (11).

1.4 Bazální ganglia

Elektrody pro hloubkovou stimulaci mozku se umísťují do oblastí bazálních ganglií. Tyto struktury se nachází v šedé kůře koncového mozku a uplatňují se primárně při řízení pohybu. Mezi bazální ganglia patří oblasti ocasatého jádra [*nucleus caudatus*], putamen a *globus pallidus* v širším pojetí mezi bazální ganglia lze řadit i *substantia innominata Reicherti*, subthalamické jádro [*nucleus subthalamicus*] a černou substanci [*substantia nigra*], dělicí se dále na dvě jádra a to *pars compacta*, která je v souvislosti s Parkinsonovou chorobou zásadní pro její schopnost produkovat dopamin a *pars reticularis* (14). Neurony *pars compacta* dopamin přenášejí axonálním prouděním do ocasatého jádra a putamen (15).

Bazální ganglia pravděpodobně pohyb pouze neřídí, ale také tento pohyb plánují, jelikož jejich aktivace začíná ještě před začátkem samotného pohybu. Oblasti stimulované při hloubkové stimulaci mozku jsou *globus pallidus* nebo subthalamická jádra a v případě pouze tremoru to jsou ventrální intermediální jádra.

2. Adheze buňka – povrch

Existují tři typy navození adheze neuronálních buněk k platformě z nanokrystalických diamantů [NCD]. První možností je coating NCD povrchu například pomocí poly-L-ornitinu. Druhá možnost je na NCD platformu žádný coating neumisťovat a nechat buňky adherovat přímo a třetí možností je navázání fragmentů extracelulární matrix na NCD platformu.

V určitých případech buňky adherují i bez speciálních povrchových molekul. Stává se ale také, že neuronální buňky neadherují k povrchu ani v případě, že je povrch upraven speciálními molekulami. Jako příklad, lze uvést situaci, kde se dospělé myši neuronální buňky při růstu v kultuře raději nedostávají do kontaktu s povrchem platformy, ačkoli je potažen poly-L-ornitinem a vrství se na gliové buňky, které jsou v kontaktu s povrchem platformy (16).

Pro adhezi neuronálních buněk *in vitro* je zásadních prvních 10 minut po nasazení do média. Pokud k adhezi neuronů nedojde v rámci tohoto časového intervalu, je pravděpodobnost adheze neuronů v následující době nízká (16).

Zásadní pro růst buněk je také přítomnost extracelulární matrix, jejíž lokální narušení způsobuje programovanou buněčnou smrt přilehlých buněk. Tento případ apoptózy se nazývá anolisis, tedy programovaná buněčná smrt způsobená ztrátou adheze [detachment induced apoptosis]. Tato teorie, která navrhuje, že porušení extracelulární matrix způsobí apoptózu, byla testovaná na cévních epiteliálních buňkách *in vivo* a ukázalo se, že k vyvolání apoptózy stačí rozrušení extracelulární matrix [ECM] (17). Je tedy pravděpodobné, že stejný princip funguje i u neuronálních buněk.

2.1 Extracelulární matrix

Extracelulární matrix je hmota, ukládající se v mezibuněčných prostorech tkání a tvoří bazální laminu. Skládá se z proteinů, glykosaminoglykanů a glykoproteinů. A k molekulám glykoproteinů se buňky přichycují pomocí integrinových receptorů umístěných buněčném povrchu. Extracelulární matrix se podílí na homeostáze, přichycení buněk, jejich růstu proliferaci a diferenciaci, polarizaci, migraci a rozmístění (18).

2.1.1 Extracelulární matrix v CNS

V mozku extracelulární matrix ovlivňuje strukturní a funkční plasticitu a funguje jako degradovatelný stabilizátor neuronů. Může například podporovat růst dendritických filopodií a trnů (19). Extracelulární matrix je také důležitá v rámci učení a paměti, protože reguluje a stabilizuje synaptickou plasticitu a vývoj myelinových buněk (19).

Aby bylo možné bazální laminu na platformách „nasimulovat“, je potřeba vědět, které proteiny extracelulární matrix jsou pro daný účel nejvhodnější – které molekuly jsou nasazenými buňkami pro adhezi vyžadovány. V tabulce [Tabulka 1] níže jsou tři třídy molekul, které tvoří extracelulární matrix

a jejich zástupci. Glykosaminoglykany uvedené jako druhá třída se dále dělí do několika skupin podle typu cukru, počtu vazeb mezi nimi a lokalizace a počtu sulfátových skupin. Ve skupině glykoproteinů je jako jeden ze zástupců uveden laminin, tvořící hlavní složku bazální laminy, který je často používán jako coatovací molekula. Laminin *in vitro* podporuje expanzi, migraci a diferenciaci neurálních kmenových buněk (20). Laminin také aktivuje integrinové receptory, čímž způsobuje růst neuritů (21). Další z glykoproteinů – fibronektin se integrinové vazby účastní také a to například přes vazebnou sekvenci GRGDSP, kterou se navazuje na $\alpha_5\beta_1$ podjednotky (22).

Mezi proteiny je zařazený kolagen, jehož struktura je schopna fungovat jako vazebná místa jak pro proteiny obsažené v extracelulární matrix, tak pro receptory na buněčném povrchu. Integrinové receptory $\alpha_2\beta_1$ se mohou navázat na jeho GFOGER sekvenci (23).

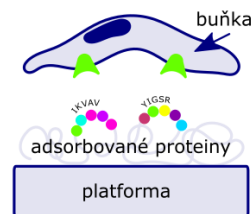
Tabulka 1

Stručné shrnutí molekul glykoproteinů a glykosaminoglykanů tvořících extracelulární matrix.
Zpracováno dle (24).

	Vybrané molekuly dané třídy
Glykoproteiny	laminin <ul style="list-style-type: none"> - 3 řetězce – α, β, γ - adheze nervových buněk fibronektin <ul style="list-style-type: none"> - glykoproteinový dimer elastin kolagen
Glykosaminoglykany [GAG]	hyaluronan chondroitin sulfát dermatan sulfát heparan sulfát keratin sulfát

2.1.2 Jaké proteiny ECM preferují neuronální buňky

V případě, že je potřeba platformy potáhnout proteiny extracelulární matrix, je zásadní vědět, které aminokyselinové skupiny jsou pro jejich adhezi zásadní. Neuronální buňky preferují sekvence YIGSR a IKVAV lamininu, na které se navazují integrinovými $\alpha_6 \beta_1$ a $\alpha_7 \beta_1$ receptory (25), tato interakce je znázorněná na obrázku 5 [Obrázek 5 (26)]. Pro nanášení molekul například zmiňovaného lamininu přesně na dané místo lze použít metodu mikrokontaktního tisku.

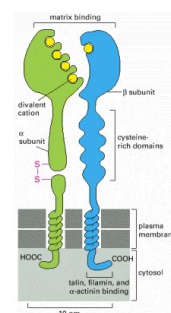


Obrázek 5

Interakce mezi neuronální buňkou s integriny a lamininem. Překresleno podle (26).

2.2 Integriny

K extracelulární matrix se buňky navazují pomocí integrinových receptorů. Integriny jsou transmembránové molekuly, skládající se z podjednotek α a β . Jedná se tedy o heterodimery a kombinace různých variant těchto podjednotek umožňuje existenci mnoha typů integrinových receptorů - konkrétně u savců se α podjednotka nachází ve dvaceti čtyřech modifikacích a β podjednotka v devíti (27). Znázornění α a β podjednotek je na obrázku 6 [Obrázek 6 (27)]. Každý typ buněk má na svém povrchu tedy specifickou kombinaci integrinových receptorů. Vzhledem k tomu, že každý z integrinů má jinou specifitu, je výhodné vědět, které integriny mají testované buňky na svém povrchu. Názorně je pestrost integrinového zastoupení vidět na obrázku [Obrázek 7 (28)].



Obrázek 6

Integrinový receptor (27).

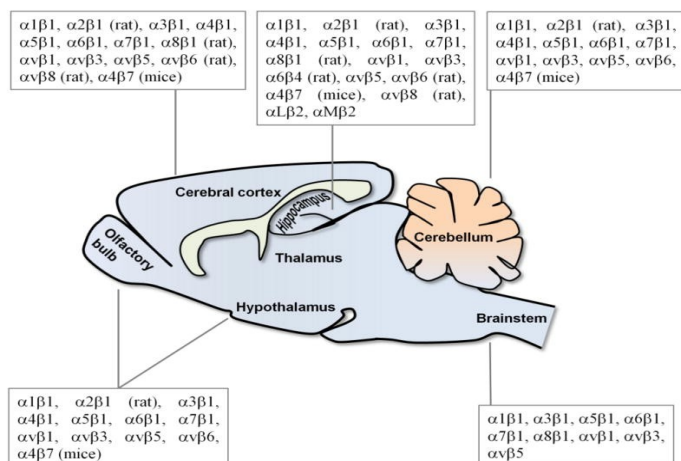
Na podjednotce α jsou vazebná místa pro Ca^{2+} nebo Mg^{2+} kationty – v závislosti na typu integrinu. Integrinové receptory jsou na navázání těchto iontů, bez nich nemohou vykonávat svou funkci. Na β podjednotce se nachází vazebné místo pro extracelulární ligand, kterým mohou být například laminin nebo fibronectin, které jsou součástí extracelulární matrix.

Z pohledu vývoje nanodiamantových platform jsou integriny zásadní pro přisednutí buněk k povrchu. Integriny po navázání ligandu mohou regulovat organizaci cytoskeletu, buněčný cyklus nebo distribuci receptorů na membráně spolu s receptory pro růstové faktory.

Celý molekulový komplex, vytvářející se základě navázání ligandu na integrin se nazývá fokální adheze. Fokální adheze by se neobešla bez cytoplazmatických proteinů, kterými jsou vinkulin, talin,

paxilin a bez aktinového cytoskeletu. Integriny spouštějí kaskádu začínající aktivací tyrosin kináz, které jsou vnitrobuněčnými přenašeči signálu.

Z důvodu, účasti integrinů na adhezi buněk nervové tkáně a extracelulární matrix (29) a následného přenosu informace z extracelulární matrix do buňky, jsou integriny také ve středu zájmu výzkumníků zabývajících se biokompatibilitou.



Obrázek 7

Schematické zobrazení integrinů na myších a potkaních buňkách v CNS (28).

2.3 Tvorba shluků

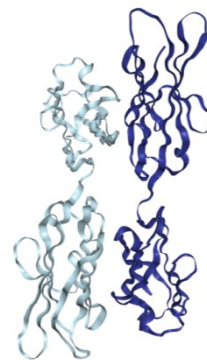
Adheze buněk nemusí vždy probíhat optimálně, za zmínku tedy stojí také problematika shlukování buněk. Tyto shluky se nazývají klastry a k jejich tvoření jsou náchylné zejména dospělé neurony. Klastry jsou tedy tvořeny buňkami, které mají tendenci se místo adheze a samostatného růstu shlukovat. Je pravděpodobné, že je to dáno nutností signálu od sousedních buněk (16). Tento fakt lze zmírnit použitím menšího množství média z důvodu menšího zředění exkretovaných faktorů a zároveň většího množství buněk v kultuře (16).

3 Adheze buňka – buňka

Kromě přichycení buněk k podkladu, je také důležitá mezibuněčná adheze. A to z toho důvodu, aby buňky mezi sebou komunikovaly a byly schopné tvořit funkční neuronální síť. Při výzkumu je snaha, tuto adhezi mezi neurony podpořit.

3.1 Neurální buněčné adhezivní molekuly [N-CAM]

V centrálním nervovém systému se vyskytují mezibuněčná spojení uskutečňovaná například neurálními buněčně adhezivními molekulami [N-CAM, někdy nazývané jako CD56]. N-CAM patří mezi imunoglobuliny, jsou transmembránové a obsahují kromě kotevní části a fibronectin like [FNIII] části také imunoglobulinové smyčky, jejichž struktura je znázorněna na obrázku 8 [Obrázek 8 (30)]. Jsou lokalizované jak na membránách neuronálních buněk tak gliových buněk. Signalizace



Obrázek 8

zprostředkovaná N-CAM, může běžet dvěma signálními dráhami. Jednou z možností je navázání N-CAM na fibroblastový růstový [FGF] receptor jiné buňky, ve které se spustí signální kaskáda, anebo přes p59fyn kinázu, která spouští kaskádu odlišnou. Obě tyto dráhy indukují růst neuritů (31) a synaptickou plasticitu.

Struktura dvou N-koncových smyček N-CAM molekuly (30).

Tato signalizace N-CAM se potvrdila v kultuře progenitorových buněk krysího hipokampu, kde N-CAM inhibují proliferaci a zvyšují množství vzniklých neuronů (32). Zároveň přítomnost N-CAM nebo neurotrofního faktoru spolu s FGF2, působících více než 12 dnů na kulturu, značně zvyšují množství jak progenitorových buněk tak neuronů (32). Důležité je zjištění, že takto vzniklé neurony, pak tvoří neurotransmitery, neurotransmiterové receptory a synaptické proteiny, které jsou stejné jako ty, které produkují maturované neurony hipokampu (32). Lze tedy takto *in vitro* nasimulovat prostředí, ve kterém by se mohly elektrody vyskytovat a následně teoreticky takto osazené elektrody implantovat, což by mohlo zvýšit šance na přijetí implantátu. Ačkoli elektrody pro terapii Parkinsonovy choroby se umísťují do jiných oblastí mozku, tato analogie by mohla fungovat i pro bazální ganglia.

N-CAM tedy patří mezi buněčné adhezivní molekuly [CAM], které jsou závislé na přítomnosti dvojmocných kationtů, stejně jako další z CAM kadheriny. Kadheriny pro navázání ligandu vyžadují přítomnost dvojmocného kationu vápníku. V případě, že vápník nemají, „sbalí“ se do konformace, která je rozštěpena protézami. Na svém N konci, který vyčnívá ven z buňky, mají vazebnou sekvenci pro ligand. Kadheriny jsou CAM, které zprostředkovávají spojení buňka-buňka a jsou lokalizované v oblasti bodových adhezních spojů a ve spojení neuron-gliová buňka (2). Jen u obratlovců je známo přes 100 druhů kadherinů (33). Pro kadheriny je typické pět opakování kadherinových domén a jeden

průchod membránou. Kadheriny jsou intracelulárně spojeny s cytoskeletem pomocí proteinů, kterým se říká kateniny a jejich funkcí je regulace polymerizace aktinu (2).

Dále existují CAM, které pro svou funkčnost vápníkové kationty nepotřebují. Jedná se o členy rodiny imunoglobulinů – viz výše. Můžeme zmínit nektiny, které zprostředkovávají interakci buňka-buňka a s aktinovým cytoskeletem jsou propojeny pomocí proteinu afadinu a nebo neurogliny, které se nacházejí v postsynaptické části a tvoří spojení s β neurxinem a podílí se tak *in vitro* na formování synapse (2). Dalšími CAM tohoto typu jsou například molekuly nektinového typu, NCAM, Syg-1, Syg-2 a Sidekicks (2).

4 Obecná charakteristika elektrod

Neurální implantáty (elektrody) se používají pro přemostění postižené nervové tkáně, zároveň ale také pro modifikaci a obnovení neurologické funkce pomocí elektrické stimulace reagující na vstupující podněty z tkáně (34). Jinak řečeno, přístroje umí zaznamenávat elektrickou aktivitu buněk a také buňky elektricky stimulovat, což umožňuje omezení projevů nemoci (35).

Při vývoji elektrod, které budou kooperovat v lidském těle s neurony, je důležité, aby materiál byl elektricky aktivní a zároveň biokompatibilní (36). V dnešní době se implantáty vyrábějí z ušlechtilých kovů a jejich slitin, což jim propůjčuje dlouhou životnost a odolnost proti korozi

(37). Nevýhodou těchto současných elektrod, je jejich obalování astrocyty, z důvodu lokálního zánětu (38). Napojení na neuronální buňky se pak stává velmi obtížné. Zároveň zde velmi často vzniká tzv. gliová jizva, která také velmi omezuje vedení signálu z elektrody (39).

Na obrázku 9 [Obrázek 9 (40)] je v současnosti (2017) využívaný typ elektrod pro hloubkovou stimulaci mozku. V části A vlákna, která mají na svém konci každá čtyři elektrody, které stimulují požadovanou oblast v mozku. V části B je samotný stimulátor s baterií, která neumožňuje opětovné dobíjení. Konkrétně v tomto případě se jedná o model, který se používá pro stimulaci u pacientů s Parkinsonovou chorobou, tremorem a dystonií. Výrobce také uvádí použití při obsedantně kompulzivní poruše (41).

Budeme-li mluvit obecně, tak se materiály pro jakékoliv implantáty dělí na dvě skupiny: na materiály bioinertní, které nepodporují adhezi buněk (například nitrooční čočky) a materiály bioaktivní, které se pokoušejí napodobovat například strukturu extracelulární matrix, jinými slovy buňku mohou vést k proliferaci, diferenciaci nebo apoptóze (26, 25). U elektrod se tedy snažíme o materiál bioaktivní. Tyto bioaktivní materiály na sobě ale nemusejí vždy mít molekuly extracelulární matrix, k adhezi buněk lze používat například i polylysin, který je nabitý kladně a na sebe přitahuje negativně nabitou membránu buňky, která pak k povrchu platformy adheruje.

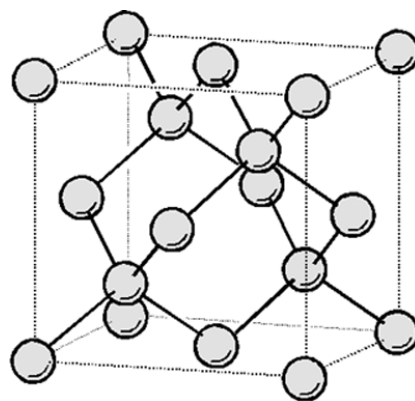


Obrázek 9

Jeden z typů elektrod pro hloubkovou stimulaci mozku (40).

5 Diamant, hlavní složka elektrodoých platform

Hlavní složkou elektrodoých platform je uhlík, ve své krystalické podobě – diamantu. Diamant je nerost, který se skládá pouze z krystalického uhlíku uspořádaného do kubické soustavy, jako je na obrázku 10 [Obrázek 10 (42)]. V přírodě diamanty pravděpodobně vznikají za velmi vysokých teplot – 900 až 1300°C. Také tlak není při růstu krystalu zanedbatelný a pohybuje mezi 4,5 – 6 GPa. Ačkoliv v přírodě a v průmyslové výrobě vznikají za velmi extrémních podmínek, jejich výroba není nijak významně finančně náročná.



Obrázek 10

Díky svým fyzikálně-chemickým vlastnostem se diamant začal testovat jako vhodný materiál pro tvorbu platform - mikroelektrodoých polí [MEA], které by mohly zaznamenávat akční potenciály neuronálních buněk bez nutnosti invaze do buňky (43). Některé vědecké týmy se zabývají vývojem retinálních implantátů – čipů, použitelných *in vivo* jako retinální implantát a některé se soustředí na léčbu neurodegenerativních onemocnění.

Kubická soustava, ve které krystalizuje diamant (42).

5.1 Nanodiamant [ND]

Jako nanodiamanty se označují krystalky, které mají velikost jednoho rozměru od 1 – 100nm.

Jednou z mnoha přínosných vlastností diamantu i nanodiamantu je jeho dlouhá životnost, která umožňuje představu elektrody, kterou nebude potřeba v průběhu let měnit. Zároveň je nanodiamant vysoce rezistentní proti bakteriální kolonizaci (44). Tato rezistence je velmi cennou vlastností a je další výhodou tohoto materiálu.

5.1.1 Výroba nanodiamantů pro tvorbu platform

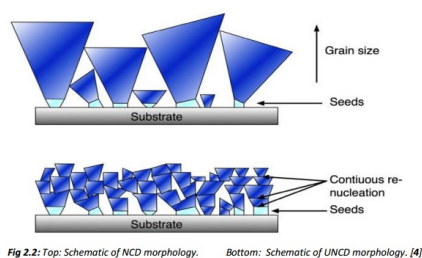
Existuje několik možností jak nanodiamantové krystalky pro tvorbu platform vyrábět. Uvedu zde tři, se kterými jsem se v článcích setkávala.

Detonační nanodiamanty [DND], se vyrábějí z větších krystalů pomocí trinitrotoluenu a hexogenu, přičemž v závislosti na tom, zda je přítomno chladicí médium, které je oxidující nebo není, může na povrchu nanodiamantů vznikat povlak grafitu (45). Grafit lze následně odstranit oxidací na vzduchu při vysokých teplotách (46). DND ale nelze zformovat do kompaktních vrstev – nemohou být použity pro ploché nebo 3D elektrody (47).

High-pressure high-temperature [HPHT] diamanty se vyrábějí, jak už název napovídá za vysokých teplot a tlaků a následným drcením (46).

Poslední varianta, kterou zde uvedu, jsou platformy vznikající pomocí chemical vapour deposition – depozice z plynné fáze [CVD], která poskytuje širší užití mimo jiné kvůli tomu, že se nanodiamanty mohou nasyntetizovat na rozličné druhy materiálů (48) jako například křemíkové matrice. Typů CVD je mnoho a liší metodou aktivace plynů, ze kterých se následně vytváří platforma. Aktivace probíhá tak, že dochází k rozkladu směsi metanu a vodíku, při sníženém tlaku a teplotě destičky 700-1000°C (49). Právě CVD platformy jsou používány pro výrobu potenciálních elektrod nejčastěji pravděpodobně kvůli nízkým nákladům na výrobu.

Pro lepší přehlednost existuje systém označování diamantových filmů, podle velikosti zrn diamantu. Velikostně mezi nanodiamanty patří ultra-nanokrystalický diamant [UNCD], kde se velikost jednotlivých zrn pohybuje kolem 5nm (tento typ zrn ale dle definice diamantu není typický diamant, protože je amorfní, tedy nevytváří krystalky a spadá do kategorie diamant podobných karbonu [DLC]) a nanokrystalických diamantů [NCD], kde je většina zrn o rozměrech 5 -100nm (48). UNCD a NCD platformy si lze představit jako strukturu znázorněnou na Obrázek 11 (48).



Obrázek 11

Schéma platformy z nanokrystalického [NCD] a ultrananokrystalického diamantu [UNCD] (48).

5.1.2 NCD platformy

Souslovím NCD platformy v tomto textu označuji destičky, které se vyvíjejí například pro použití při hloubkové stimulaci mozku. Nanodiamantové destičky, jsou složeny z matrice, která může být například skleněná a zrnko diamantu nanoskopických rozměrů, která slouží jako nukleační centra pro růst diamantových krystalků, které tvoří nejsvrchnější vrstvu sondy. NCD jsou vhodným materiálem pro biotechnologické užití z důvodu jejich chemické a biochemické odolnosti, odolnosti vůči naleptání, výborným mechano-optickým vlastnostem a poréznímu povrchu (50).

Vítanou vlastností nanodiamantu je jeho propustnost pro infračervené až po ultrafialové záření. Propustnost pro záření je vhodná pokud je potřeba *in vitro* fluorescenčně značit buňky při zjišťování závislosti elektrických vlastností na biochemické aktivitě povrchu.

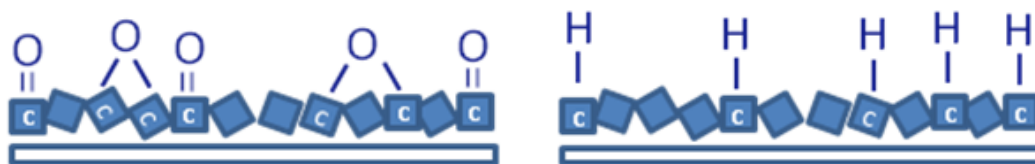
V literatuře se také často skloňuje homoepitaxiální a heteroepitaxiální růst nanodiamantových krystalků. Jedná se o označení způsobu vzniku povrchu platformy. V případě homoepitaxiálního vzniku krystalky rostou na podložce ze stejného materiálu – tedy na diamantovém podkladu. Heteroepitaxiální krystalky vznikají na podložce z materiálu odlišného složení – například na Si podložce.

V roce 1995 vědci ze skupiny L Tanga udělaly první srovnávací analýzu nanodiamantového filmu vytvořeného metodou CVD. Nejednalo se o testování biokompatibility se specifickým typem buněk. Výzkum byl obecný a zaměřený na to, zda je možné tento typ materiálu použít jako implantát (51). Vzorek byl implantován do peritoneální dutiny myši a následně po vyjmutí z byl zkoumán elektronovým mikroskopem (51). Autoři článku se domnívají, že buňky, které se dostaly do kontaktu s implantátem, raději než aby adherovaly k NCD jako takovému, raději preferovaly místa, kde byla vrstva proteinů (51). Míra biokompatibility byla určována dle produkce fibrinogenu, který by se v případě nepřijetí implantátu produkoval na povrch buněk. CVD diamant se projevil jako velmi dobrý materiál, který je biokompatibilní.

5.1.2.1 *Povrchové úpravy NCD platformy*

Povrch nanokrystalických diamantů lze také obohacovat například o atomy vodíku, které mu propůjčí vodivost a hydrofobicitu a nebo o kyslík, který způsobí, že diamant bude hydrofilní a bude mít vysoký elektrický odpor. Pro vznik NCD s vodíkovým zakončením, jehož schéma je znázorněno na obrázku 12 [Obrázek 12 (52)] je potřeba na čistý (čištění vede k oxidaci povrchu NCD a odstranění karbidů nebo grafitových formací) NCD vzorek nechat působit vodíkové plazma po dobu 60 minut při teplotě 2270K (53), což je pro představu přibližně 1997°C. NCD s kyslíkovým zakončením se vyrábějí tak, že se NCD vzorek nechá ozařovat UV světlem z deuteriové lampy (má vlnovou délku 160 - 400nm) po dobu jednoho nebo více dnů na vzduchu při pokojové teplotě (53).

Také poréznost [pojem poréznost se zde užívá ve stejném smyslu jako v odborné literatuře jako synonymum pro drsnost] vzorku má vliv na hydrofobicitu a pravděpodobnost adheze neuronu k platformě NCD (53).



Obrázek 12

Schéma NCD platformy, které jsou obohacené buď o atom kyslíku a nebo vodíku. Spodní obdélníky v obou obrázcích znázorňují například křemíkovou matici, na které jsou zrnka NCD. Překresleno a upraveno dle (52).

Jedním z přístupů k vytvoření výraznějšího reliéfu je depozice nanokrystalického diamantu NCD na uhlíkových nanotrubičkách. Výroba probíhá tak, že se na matrici nanese pomocí elektronového paprsku 7 nm tenká vrstva niklu při teplotě 700 °C po dobu tří minut. A následně se na niklovém základu nechají vyrůst uhlíkové nanotrubičky, které se v dalším kroku pokryjí nanodiamantovými částicemi (36). Schéma tohoto uspořádání je na obrázku 13 [Obrázek 13]. Nanodiamantové částičky se většinou používají vytvořené detonační metodou.



Obrázek 13

Schéma NCD platformy s nanotrubičkami úplně nahoře je znázorněn NCD, pod ním jsou uhlíkové nanotrubičky, následuje vrstva niklu a vespod je matrice. Vlastní tvorba.

Samotný diamant ale nesplňuje pro aplikaci jeden zásadní požadavek, a to vodivost. Proto se NCD takzvaně dopují nebo jinak řečeno obohacují o atomy boru, které NCD tuto vlastnost propůjčují. U boru stačí koncentrace $2 \times 10^{21} \text{ cm}^{-3}$ (54) díky němuž se z nanodiamantu stává p-přechod nebo ve vyšších koncentracích ($>10^{20} \text{ cm}^{-3}$) polovodič (36). Postup výroby dopovaného nanodiamantu [BNCD] je téměř stejný jako bez příměsí boru. Rozdílem v syntéze NCD a BNCD je přítomnost trimethylboranu $[\text{B}(\text{CH}_3)_3]$ v plynné fázi.

Na bor je ale dobré dát si pozor, protože pro mnoho buněk je potenciálně jedovatý (39). Nicméně dvě práce uvádějí, že NCD dopovaný borem nemá žádný pozorovatelný vliv na přichycení, proliferaci a životaschopnost buněk (36, 39). Ačkoli NCD dopované borem nemají prokazatelný vliv na růst neuronů, vytvoření nanostruktury pomocí nanotrubiček vede k lepšímu prospívání buněk na NCD (36). S výrobou mikroelektrodového pole založeného na BNCD, již má zkušenosti výzkumný tým Piret et al., jejichž BNCD MEA schopna zaznamenávat i buněčné impulzy o malé amplitudě (35). Právě tento výzkumný tým vytvořil 3D nano strukturovaný povrch z borem dopovaných diamantů, který propojil s MEA technologií a biokompatibilitu testoval na hipokampálních a míšních buňkách myších embryí (35). Výsledky tohoto testu biokompatibility byly uspokojivé, protože byly srovnatelné s jinými platformami s borem dopovanými diamanty, u kterých je jejich vhodnost pro buňky ověřená (35).

5.1.2.2 *Úpravy povrchu po zlepšení adheze*

Z předchozích odstavců vyplývá, že existuje mnoho variant jak navodit adhezi neuronálních buněk k platformám. Platformy s NCD filmy by se tedy podle způsobu povrchové úpravy daly rozřadit takto:

- a- Platformy s fragmenty ECM nanesenými na povrchu
- b- Platformy s molekulami nanesenými na povrchu, které navozují adhezi buňky k povrchu na základě elektrostatických sil
- c- Platformy, jejichž povrchová struktura sama o sobě navozuje adhezi buněk

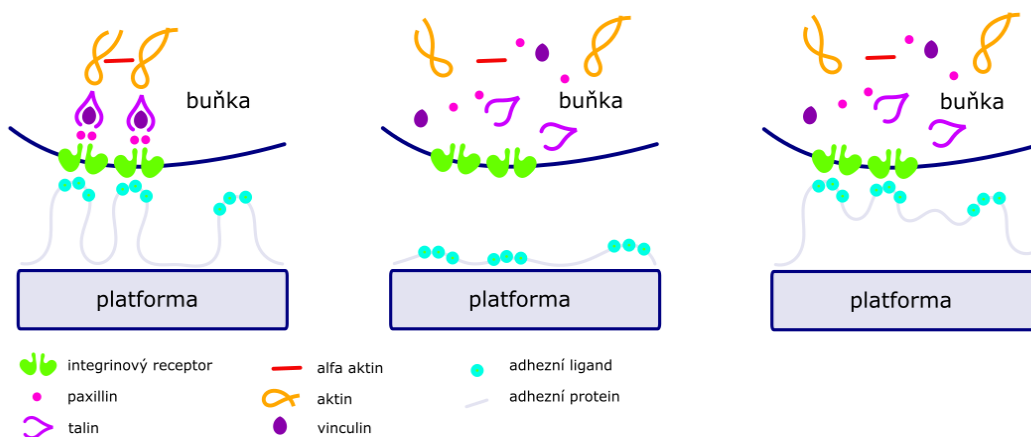
a – Platformy s fragmenty ECM nanesenými na povrchu

V případě, že se materiál snaží o imitaci extracelulární matrix, na platformu jsou naadsorbované molekuly, které jsou v ECM obsaženy, a buňka se svými receptory na tyto molekuly váže. Nemusí se jednat o celé proteiny ECM, ale pouze klíčové sekvence aminokyselin.

Ve studii Ch G Spechta 2004 (55) byl diamantový povrch potažen pomocí mikro-kontaktního tisku myším lamininem. Laminin na povrchu diamantu tvořil mřížku a po nasazení fetálních neuronů na tyto destičky se ve výsledku neurony uchytily z většiny na potažených místech. V článku ale není uvedena poréznost použitého povrchu, která má na to, zda se neurony na povrch přichytí vliv z nezanedbatelné části. Lze tedy pouze vyvozovat, že laminin nanesený mikrokontaktním tiskem opravdu umožňuje adhezi neuronálních buněk a lze ho využívat jako pozitivní kontroly.

To jestli se platformu podaří potáhnout proteiny ECM, nebo jejich částí je významně ovlivněno přítomností funkčních skupin [OH, NH₂], smáčivostí povrchu, morfologií povrchu, mechanickými vlastnostmi (například tuhost) a elektrickými vlastnostmi (vodivost, náboj).

Hydrofobicita platformy není optimální v případě, že se povrch obohacuje, protože na takovýto povrch nelze naadsorbovat potřebné molekuly ve vhodném postavení. Ale ani opačný extrém není vhodný. V případě, že je povrch extrémně hydrofilní, nanesené proteiny nejsou k povrchu přilnuty stabilně a spojení mezi buňkou a proteinem není odolné (56). Problematika hydrofobicity a hydrofility je znázorněna na obrázku 14 [Obrázek 14 (56)]. V horní části každého z obrázků jsou proteiny fokální adheze, které interagují s adhezními ligandy, které jsou navázané na platformě. První obrázek je znázornění mírně hydrofilního povrchu, na který lze navázat proteiny v optimálním postavení. Další dva obrázky jsou extrémní případy hydrofobního a hydrofilního povrchu, který neumožňuje sestavení fokální adheze.



Obrázek 14

Mírně hydrofilní povrch zobrazený na prvním obrázku, se vyznačuje menším kontaktním úhlem než 90 stupňů.

Hydrofóbní povrch, který je na druhém z obrázků má kontaktní úhel větší než 150 stupňů.

Extrémně hydrofilní povrch na posledním obrázku se vyznačuje kontaktním úhlem blízkým 0 stupňů. Překresleno dle (56)

b- Platformy potažené molekulou, která navozuje adhezi buňky k povrchu na základě elektrostatických sil

Zde se využívá faktu, že buněčná membrána je záporně nabitá a molekula na platformě je nabitá kladně. Je to poměrně jednoduchý nenáročný postup, jak v buňkách podnítit adhezi k povrchu. Při vývoji elektrod pro hloubkovou stimulaci mozku je ale snaha se takto přidaným látkám vyvarovat. Důvodem je potenciální vliv těchto molekul na elektrickou interakci mezi diamantovým povrchem a neuronální membránou, nebo může jednoduše vadit prostor, který tyto exogenní molekuly zabírají mezi destičkou diamantu a buňkou (57).

Ve výzkumu biokompatibility elektrod se takovýchto molekul využívá, jako příklad lze uvést molekulu polylysinu, který funguje jako kontrola pro ověření schopnosti buněk adherovat k povrchu. Jamky se většinou potahují pomocí roztoku poly-D-lysinu v PBS [PBS je fosfátový pufr umožňující udržení neutrálního pH] a tento roztok se po době v rámci jedné až dvou hodin v 36°C odsaje a usuší (55).

P W May et al. (39) konstatuje, že platformy s CVD diamanty s O zakončením, které jsou potažené poly-lysinem se jeví jako velmi dobrý povrch pro kultury neuronů, nicméně pouze po tu dobu, kdy je na povrchu poly-lysin. V případě, že na platformě není poly-lysin, není pozorovatelný žádný růst neuronů (39).

c — Platformy, jejichž struktura materiálu sama o sobě navozuje adhezi buněk

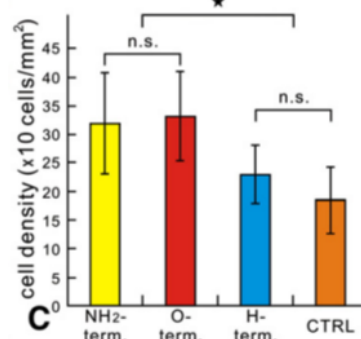
Obecně buňky špatně interagují s cizorodými materiály, proto je potřeba myslet na to, aby použitý materiál co nejlépe mimikoval buňkám přirozené prostředí (19).

Výzkum A Vosse et al. (58) se zabývá právě růstem neuronálních buněk na ND platformách, které na sobě nemají žádnou molekulu ECM. Výstupem z jejich práce je zjištění, že buňky, které jsou na ND platformách zakončených NH_2 skupinou nebo kyslíkem podporují růst buněk více než kontrola (58). Zároveň si v tomto pokusu ani ND platformy s H zakončením nevedly špatně a neurony na nich rostly

srovnatelně jako na kontrole (58) viz obrázek 15 [Obrázek 15 (56)].

Dokazuje to i pokus s GT1-7 prolifерující buněčnou linií myšího hippocampu, kde neurony adherovaly jak k NCD se zakončením pomocí vodíku tak s kyslíkem (53). Důvodem snahy pěstovat neurony na

NCD bez dalších přidaných látek na povrchu - jako je například laminin je fakt, že tyto molekuly díky své velikosti vytváří relativně velký prostor mezi elektrodou a buňkou, což může mít vliv na elektrické interakce mezi povrchem elektrody a membránou neuronu (53).



Obrázek 15

Porovnání růstu buněk na površích s různou terminální úpravou (58).

6 Biokompatibilita

Biokompatibilita vystihuje schopnost buněk se množit a být vitální a metabolicky aktivní.

6.1 Makroskopické znaky napovídající o viabilitě buněk

V rámci výzkumu se viabilita buněčných kultur hodnotí také dle makroskopických znaků. Každý typ buněk v CNS se ve stejných podmínkách chová odlišně, což vychází z jejich odlišného funkčního určení. Jako příklad lze uvést situaci, kdy v médiu bez séra je podpořen růst neuronálních buněk, oproti tomu gliové buňky v tomto prostředí neprosperují.

V případě, že je potřeba v kultuře udržovat jak neuronální buňky, tak buňky gliové, využívá se například suplementu NB21, který je vyvinut přesně pro neuronální buňky a zároveň séra, které podporuje regeneraci a proliferaci gliových buněk. Je tedy přítomno médium [v mnoha výzkumech se využívá, neurobasal medium, které je modifikací klasického Eagles media], dále suplement pro podporu regenerace neuronálních buněk a sérum umožňující proliferaci gliových buněk

V případě, že v kultuře dochází k mohutné apoptóze, projeví se to už na barvě média. Médium se na základě nízkého pH v cytoplazmě okyselí a mírně změnění zbarvení.

Při pohledu na neuronální buňky, se soustředíme na jejich adhezi k povrchu. V případě, že povrch platformy není pro buňky vhodný, začnou tvořit takzvané klastry. Jedná se o uskupení mnoha neuronů, které dávají přednost mezibuněčnému kontaktu před adhezí k povrchu. Tyto struktury jsou snadno pozorovatelné ve světelném mikroskopu díky jejich velikosti. Klastry mohou být vzájemně propojené a tvořit jednoduchou neurální síť. Dalším projevem nepříliš vhodného prostředí je v případě kokultury gliových buněk a neuronů navrstvení neuronálních buněk na buňky gliové. Ačkoli buňky tvoří síť na platformě, gliové buňky tvoří „odstínění“ proti impulsům, které by pocházely z platformy. Je to podobné, jako v případě současně používaných elektrod, které jsou postupně obalované gliovými buňkami, které tvoří tzv. gliovou jizvu.

Jestliže se neuronům na platformě daří, jsou zploštělé, mají mnoho výběžků, kterými se vzájemně propojují a tvoří tak neuronální síť. Nicméně takto viditelná síť nezaručuje její funkčnost. Může se stát, že buňky budou vzájemně propojené, ale nebudou schopné si vzájemně předávat vzruchy, což by byl zásadní problém. V optimálních podmínkách se nebudou v médiu vznášet apoptické buňky. Už apoptóza části buněčné populace může spustit řetězovou reakci, na základě snížení pH kultivačního roztoku.

6.2 Měření biokompatibility buněk na NCD destičkách

Pro posuzování míry viability buněk na NCD povrchu se dá využít barvení methylenovou modří, která umožňuje pozorovat a kvantifikovat buňky, které jsou živé, tedy neobarvené (barvivo se do buněk

dostává kvůli zvýšené propustnosti cytoplazmatické membrány) (36). Z důvodu toxicity methylové modři se počítání buněk musí provádět ihned po barvení. Nevýhodou této metody je, že počítání obarvených buněk může být výrazně ovlivněnou chybou osoby, která buňky analyzuje.

Další možností je měření laktátdehydrogenázy [LDH] obsažené v médiu. Pokud by kultura byla zdravá, obsah LDH by byl nízký, protože se jedná o cytoplazmatický enzym, který se dostane ven z buňky pouze při jejím porušení. LDH je obsažený ve všech buňkách, protože je součástí laktátového cyklu, kde katalyzuje oxidaci L-laktátu na pyruvát. Testování probíhá tak, že se odebírají supernatanty z jamek, kde je NCD vzorek a následně je spektrofotometricky určena hladina LDH. Metoda LDH ani barvení methylnmodří nevypovídá o schopnosti buněk množit se.

Také lze viabilitu měřit pomocí propidium jodidu [PI]. PI prostoupí pouze do buněk s porušenou cytoplazmatickou membránou a následně je procento buněk, které obsahují PI kvantifikováno na průtokovém cytometru.

Pomocí PI se dá také dělat analýza buněčného cyklu, protože PI je molekula, která se váže na DNA, pokud se membrána buňky permeabilizuje. Pomocí průtokového cytometru se pak určí podle hodnoty fluorescence buňky [navázaného PI] v jaké fázi buněčného cyklu buňka je. A to na základě toho, že se v buňce mění množství DNA [a tím i množství navázaného PI] – například před dělením buňka syntetizuje novou DNA a tudíž je v tuto chvíli v dané buňce dvakrát více DNA než po buněčném dělení (59).

Existuje mnoho dalších metod, kterými lze zjišťovat, jestli buňky rostou, jestli jsou metabolicky aktivní nebo jestli se množí. Například pomocí MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) se zjišťuje metabolická aktivita mitochondrií.

Ani jedna z metod není specifická pro jeden buněčný typ a tak nelze zjistit, kterým buňkám se na povrchu nedaří.

7 Hodnocení adheze buněk k NCD

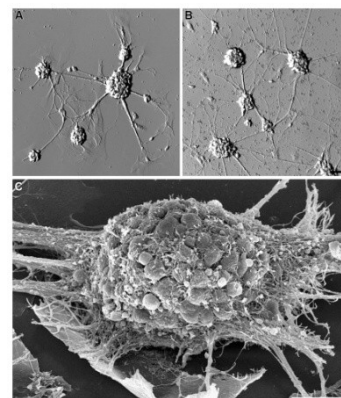
Pro budoucí použití destiček jako elektrod je také důležité hodnotit, zda se buňky ochotně přichycují k povrchu NCD a jakou mají morfologii (zda tvoří nepřirozené struktury napovídající o špatném stavu buněk).

Buňky, které se nepřichytily k podkladu/platformě se odmyjí a při barvení jsou vidět pouze adherované buňky. Na fluorescenční značení lze použít například CMFDA, který lze použít, když je potřeba označit celou buňku, nejen její cytoskelet (36), Hoechst se používá pro barvení jádra a Phalloidin pro značení F-aktinu. Existují i specifické protilátky pro molekuly, které se vyskytují pouze u neuronů (MAP2, β -III-tubulin). GFAP je marker gliových buněk (60). Tímto způsobem lze například zjistit, jaké procento buněk přichycených k NCD platformě jsou neurony. To je důležité, protože výzkum NCD platform směřuje k tomu, aby mezi NCD platformou a neurony bylo co nejméně gliových buněk, které by neurony izolovaly.

Zároveň (vzhledem k tomu, do jakých podmínek jsou elektrody vyvíjeny) je důležité, aby rostly na NCD destičkách buňky co nejpodobněji jako *in vivo*.

8 Studie biokompatibilitý platform z nanokrystalických diamantů

Kultura primárních embryonálních [E17] buněk hipokampu a buněk hipokampu čerstvě narozených krys (neurony, glie) při pěstování na neošetřeném NCD a neošetřeném skle velmi špatně adheruje a tvoří buněčné shluky (47). Při pěstování stejných kultur na NCD a skle ošetřeném PLD-lamininem buňky adherují dostatečně a tvoří sítě neuritů (47). Může ale docházet ke shlukování buněk - buňky se přednostně váží na buňky ve svém okolí. Toto je nežádoucí z důvodu malého kontaktního povrchu mezi buňkami a destičkou (47). Jinak řečeno, buňky spíše než by adherovaly k povrchu platformy dají přednost mezibuněčné adhezi. Někdy se tomuto stavu říká klastry, a jak mohou vypadat je vidět na obrázku 16 [Obrázek 16 (61)]. V pokusech, kde se zjišťuje schopnost nervových buněk adherovat k NCD se často využívá právě buněčné linie GT1-7 což jsou myší neurony hypothalamu, které jsou diferencované a elektricky excitovatelné (53).

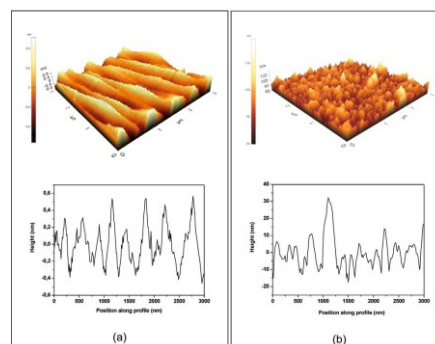


Obrázek 16

Dva obrázky z optického a jeden elektronového mikroskopu zobrazující tvoření shluků neuronálními buňkami (61).

Ke kyslíkem zakončeným NCD a vodíkem zakončeným NCD, které nejsou potažené žádnou chemickou látkou GT1-7 buňky adherují se stejnou intenzitou a tato intenzita je porovnatelná s růstem na plastu (53) - polystyrenu. Oproti tomu GT1-7 buňky na OMO destičkách (homoepitaxiální diamant) s H nebo O zakončením rostou hůře než na plastu a NCD (53). Nicméně i na OMO mohou neurony GT1-7 prosperovat jestliže se povrch ošetří poly-L-lysinem, který zlepšuje buněčnou adhezi (62). Také P Ariano et al. uvádí, že buněčná linie myších neuronů hypothalamu GT1-7 adheruje na platformy bez jakékoli další povrchové úpravy kromě H- a O- zakončení na NCD platformě (53).

U OMO destiček bez povrchového ošetření hodně záleží na tom, jak moc je povrch hydrofilní, tedy čím víc hydrofilní je, tím raději na něm buňky rostou (53). Na obrázku 17 [Obrázek 17 (53)] je 3D model homoepitaxiální a heteroepitaxiální platformy, kde je vidět, rozdílnost takto připravovaných povrchů.



Obrázek 17

Většina studií se zabývá možnostmi, jak chemicky upravit povrch nanodiamantových destiček, aby na ně neurony ochotně adherovaly. Jedna ze studií se ale zabývala i výrobou prototypů MEA na skleněné matrici, která by byla použitelná pro *ex-vivo* experimenty, byla tedy dostatečně kompaktní a byla vyhotovena z materiálů, které pozitivně korelují s ochotou neuronů adherovat. Podařilo se vytvořit MEA s 264 elektrodami na povrchu o rozměrech 28,8mm² (63).

V levé části obrázku, která je označená jako (a) je 3D struktura vzorku, který je homoepitaxiální. V druhé části, označené jako (b) je heteroepitaxiální NCD platforma (53).

Pro úspěšné fungování NCD MEA, je nutné, aby byl diamant dopovaný prvkem, který mu propůjčí vodivost. A Vaitkuviene et al. prováděli testování NCD jak s vodíkovým, tak s kyslíkovým zakončením u borem dopovaných NCD. Jako vzorové buňky měli SH-SY5Y, což jsou lidské buňky neuroblastomu. Tyto buňky s NCD povrchy pravděpodobně neměly problém, protože skupina všechny vzorky (O-NCD, H-NCD, BNCD-O, BNCD-H) označila jako biokompatibilní (64). Buňky vykazovaly na všech vzorcích přibližně stejnou hodnotu aktivity dýchacího řetězce, která byla stanovena MTT reakcí (64). Tato skupina také zjistila, že v případě, že v médiu není přidáno sérum, adheze a růstový potenciál buněk je závislý na množství buněk, které byly na jamku nasazeny. Když nasadili větší množství buněk, adheze byla pozorovatelně vyšší (64). Tento stav vysvětlují tak, že buňky v případě větší hustoty raději tvoří mezibuněčná spojení (64).

M Amaral et al. také testoval biokompatibilitu NCD platform. Jako vzorové buňky byly použity L929 a HG fibroblasty [human gingival – lidské fibroblasty z dásně] (65). Ačkoli byly obě kultury udržovány ve stejných podmínkách, L929 po celou dobu vykazovaly vysokou hodnotu proliferace na rozdíl od buněk sliznice dásně, které byly týden po vysazení v lag fázi (65). Následně se začaly exponenciálně množit, nicméně ne s takovou intenzitou jako L929 buňky (65). Výsledkem je, že na NCD platformách obě buněčné kultury prosperovaly o malinko lépe než na kontrolních vzorcích (65), ale každá z kultur v jiném měřítku.

Jeden z výzkumů se také zaměřoval na růst neuronálních buněk [krysích embryonálních buněk hippocampu E17] na NCD s H- nebo O- povrchovým zakončením. Jejich hipokampální buňky se na těchto substrátech shlukovaly a upřednostňovaly mezibuněčný kontakt před adhezí k NCD povrchu. Kontakt s povrchem NCD měly primárně gliové buňky (47). Zde se tedy NCD povrch nechoval jako biokompatibilní. Jako kontrola byl používán PLD-laminin na NCD. Jak píše S M Ojovan (47), tak jedním z vysvětlení proč v některých studiích na nanodiamantové platformy neuronální buňky adherují a v například jejich případě to tak není, by mohl být rozdíl ve výrobě.

Thalammer et al. studoval adhezi neuronálních buněk [myší hipokampální neuronální buňky, E18] na NCD povrch, který byl ještě povrchově upraven druhou vrstvou nanodiamantů, ve srovnání s NCD bez této úpravy se dařilo lépe buňkám na platformách se dvěma vrstvami ND (66). Na základě vyhodnocení stejnoměrného růstu jak neuronů, tak gliových buněk Thalammer et al. usuzuje, že by zde byl potenciál pro adhezi a růst neuronů přímo na ND vrstvě a ne na vrstvě gliových buněk (66). Ve stejném případě byl také testován růst neuritů a měření, zda jsou neurony elektricky aktivní. Výsledkem bylo, že růst neuritů je srovnatelný a neurony jsou elektricky funkční a neuronální síť je propojená (66).

Pro lepší přehlednost uvádím tabulku [Tabulka 2] znázorňující, zda použitý povrch je nebo není biokompatibilní s uvedenými buňkami.

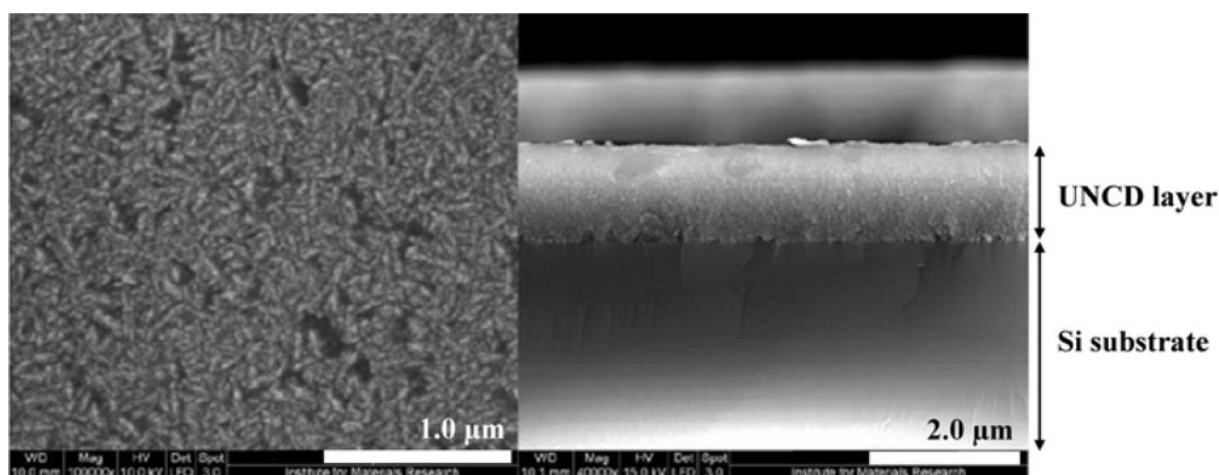
Tabulka 2

Srovnávací tabulka, v níž je uvedeno, jaký typ povrchu byl testován s jakými buňkami a zda byl povrch hodnocen jako biokompatibilní.

Typ platformy	Typ buněk	Biokompatibilita	Adheze	Vedení vzruchů	Morfologie	Coating
✗ NCD	E17 hipokampus – Rat	Ne	Velmi špatná	-	Shluky	Ne (37)
✓ NCD	E17 hipokampus – Rat	Ano	Ano	-	Sítě	PLD-laminin (37)
✗ Sklo	E17 hipokampus – Rat	Ne	Velmi špatná	-	Shluky	Ne (37)
✗ NCD	N1 hipokampus – Rat	Ne	Velmi špatná	-	Shluky	Ne (37)
✓ NCD	N1 hipokampus – Rat	Ano	Ano	-	Sítě	PLD-laminin (37)
✗ Sklo	N1 hipokampus – Rat	Ne	Velmi špatná	-	Shluky	Ne (37)
✓ O-NCD	GT1-7	Ano	Ano	-	-	Ne (53)
✓ H-NCD	GT1-7	Ano	Ano	-	-	Ne (53)
✓ Plast	GT1-7	Ano	Ano	-	-	Ne (53)
✗ O-OMO	GT1-7	Ne	Špatná	-	-	Ne (53)
✗ H-OMO	GT1-7	Ne	Špatná	-	-	Ne (53)
✓ OMO	GT1-7	Ano	Ano	-	-	Poly-L-lysine (62)
✓ O-NCD	SH-SY5Y	Ano	Ano	-		Ne (64)
✓ H-NCD	SH-SY5Y	Ano	Ano	-		Ne (64)
✓ BNCD-O	SH-SY5Y	Ano	Ano	-		Ne (64)
✓ BNCD-H	SH-SY5Y	Ano	Ano	-		Ne (64)
✓ NCD	L929 – mouse	Ano	Ano	-		Ne (65)
✓ NCD	HG fibroblasts	Ano	Ano	-		Ne (65)
✓ - biokompatibilní, ✗ - nebiokompatibilní, „-“ - neznámá hodnota						

9 Biokompatibilita platform z ultra nanokrystalických diamantů [UNCD]

Vývoj probíhá i na platformách UNCD, jak takovéto platformy vypadají je vidět například na obrázku 18 [Obrázek 18 (67)]. Y C Chen et al. poukazuje na to, že pravděpodobně už samotná morfologie povrchu UNCD platformy, může mít vliv na diferenciaci buněk. Výzkum probíhal na H-UNCD platformách, na kterých byla kultura neurálních kmenových buněk. Výzkum dospěl ke zjištění, že neurální kmenové buňky na tomto povrchu se bez přidání běžně používaných cytokinů diferencovaly do neuronů (68).



Obrázek 18

Pohled na UNCD platformu. Vlevo je pohled shora na platformu. V pravé části je pohled z boku, kde ve spod je křemíková matrice na níž je vrstva ultrananokrystalických diamantů. Oba snímky jsou z elektronového mikroskopu (67).

10 Biokompatibilita platform z polykrystalických diamantů [PCD]

PCD platformy, které byly před použitím převrstveny nanodiamantovými částicemi pro zvýšení poréznosti povrchu [na PCD substrát byly nanoseny nanodiamantové částice ultrasonikací] neuronálním buňkám [myši hipokampální neurony, E18] pravděpodobně vyhovovaly. Jejich adheze byla srovnatelná jako adheze na skle potaženém lamininem a poly-DL-ornitinem (66).

Závěr a diskuze

Každý z výzkumů zabývajících se těmito platformami jde trochu jiným směrem, některé publikace se zaměřují na vývoj implantátů pro hloubkovou stimulaci mozku jako pomoc lidem postiženým Parkinsonovou chorobou, jiné se zaměřují na snižování bolestivých vjemů při chronické bolesti. Dle mého názoru velmi rozporuplný je výzkum ohledně obsedantně kompulzivní poruchy. Dále existují výzkumy zabývajících se možností aplikace NCD elektrod do postižené sítnice a nahrazení její funkce. Je tedy možné, že jednou se budou používat NCD elektrody jako pomoc pro nejružnější poškození a poruchy. Tato rozmanitost v tom, pro jaký účel by NCD platformy mohly být používány s sebou nese to, že v každém z výzkumů se využívá jiného typu buněk. Je to logické ale zároveň výsledky výzkumných skupin se těžko porovnávají, protože tyto buňky mají jiné vlastnosti a nechovají se stejně.

Velké množství testů se dělá na myších neurálních kmenových buňkách, což je otázkou jestli pro výzkum nanodiamantových elektrod pro hloubkovou stimulaci mozku má nějaký hlubší význam. Parkinsonovu chorobu mají hlavně starší lidé a jejich kmenové buňky již nejsou přítomny v takovém množství.

Zároveň elektrody pro hloubkovou stimulaci mozku se při Parkinsonově chorobě umísťují do *globus pallidus* nebo subthalamického jádra a v případě pouze tremoru do ventrálního intermediální jádra, kde se vyskytuje morfologicky a funkčně jiný typ buněk. A tyto buňky je obtížné nasadit do experimentu *in vitro*.

Ohledně kultivace buněk může mít na výsledky testů vliv také to, že při pasážování buněk pro experiment, se buňky odmývají z povrchu a dá se říct, že ty nejvitálnější buňky, které se při standardní době trypsinizace neodmyjí, se do experimentu nedostanou.

Další otázkou je, zda se z nanodiamantových platform v průběhu času nebudou uvolňovat částičky, které by mohly způsobovat zdravotní problémy. U nanočástic je například prokázáno, že mohou vnikat do buněk a následně se usazovat organelách (69). Zároveň DND mohou ovlivňovat životnost buněk, menší měrou životnost ovlivňují HPHT diamanty (46).

Cestou ke zlepšení biokompatibility a adhezivity NCD platform může být modifikace topografie. Tedy změny například poréznosti díky deponovaným Si nanotrubičkám, změnou velikosti krystalových zrn a samozřejmě dalšími dosud nevyvinutými technikami.

Určité typy topografie a složení NCD platforem umožňují přímou kultivaci nervových buněk *in vitro*, nicméně celkový dojem z literatury není zatím přesvědčivý. Všeobecně NCD platformy za určitých podmínek biokompatibilní jsou.

Jinak je dle mého názoru cesta k elektrodám pomáhajícím tlumit projevy některých nemocí určitě skvělý nápad. Zároveň a to už je ale mimo výše zmíněné výzkumy, by se dalo elektrody pro hloubkovou stimulaci mozku ještě dále zlepšovat z technického hlediska. Například aby šly baterie ve zdrojích pulzů dobíjet pravděpodobně indukčně a měly delší životnost než uváděné tři roky (výrobce Medtronic), ale i když se v elektrotechnice nepohybují myslím, že než bude dostupná baterie požadované kapacity a rozměrů, která by vydržela dostatek nabíjecích cyklů a měla certifikaci pro použití v lékařství, bude to ještě chvíli trvat.

Podle mě je také možnost vylepšovat kompatibilitu těchto přístrojů s magnetickou rezonancí. Vzhledem k tomu, že magnetická rezonance je z důvodu své šetrnosti k tkáním často využívanou vyšetřovací metodou, bylo by optimální, kdyby pacienti s přístroji pro hloubkovou stimulaci mozku měli plnohodnotnou možnost magnetickou rezonanci podstupovat. V některých případech pacienta s implantovanou sondou nelze vyšetřit. V případech, kdy pacienta magnetickou rezonancí vyšetřit lze, musejí být splněny podmínky udávané výrobcem, ale obecně se jedná například o intenzitu elektromagnetického pole, které většinou nesmí přesáhnout 1,5 Tesla (70). Pravděpodobně hlavním důvodem proč jsou zde tato omezení je potenciální zahřátí součástí přístroje (70).

Citovaná literatura

1. [Online] <https://becominghuman.ai/what-is-an-artificial-neuron-8b2e421ce42e>.
2. H Togashi, T Sakisaka, Y Takai. Cell adhesion molecules in central nervous system. *Cell adhesion and migration*. 2009, 3, stránky 29-35. sekundární citace.
3. [Online] <http://jcs.biologists.org/content/116/1/17>.
4. [Online] 17. 7 2018. <https://is.muni.cz/el/1431/podzim2010/Bi7575/um/FKB-NeuralSC2010.pdf>.
5. S Filip, J Mokřý, I Hruška. *KMENOVÉ BUŇKY*. místo neznámé : Galén, 2006. 8072624016.
6. V Darsalia, T Kallur, Z Kokaia. Survival, migration and neuronal differentiation of human fetal striatal and cortical neural stem cells grafted in stroke – damaged rat striatum. *European journal of neuroscience*. 2007, 26, stránky 605-614.
7. P Taupin, FH Gage,. Adult neurogenesis and neural stem cells of the central nervous system in mammals. *Journal of neuroscience research*. 2002, 69, stránky 745-749. sekundární citace.
8. P Taupin. Neural progenitor and stem cells in the adult central nervous system. *Annals of the Academy of Medicine*. 2006, 35, stránky 814-820. sekundární citace.
9. T Glaser, S M Pollard, A Smith, O Brüstle. Tripotential Differentiation of Adherently Expandable Neural Stem (NS) Cells. *Plos one*. 2007, 3, strany e298.
10. CM Jacque, C Vinner, M Kujas, M Raoul, J Racadot, NA Baumann. Determination of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in human brain tumors. *Journal of the Neurological Sciences*. 1978, stránky 147-155.
11. [Online] 17. 7 2018. <http://psych.lf1.cuni.cz/bp/1.4.htm>.
12. [Online] [Citace: 16. 7 2018.] <http://psych.lf1.cuni.cz/bp/1.4.htm>.
13. [Online] [Citace: 16. 7 2018.] <http://www.avcr.cz/cs/pro-media/aktuality/Gliove-bunky-zname-i-nezname>.
14. M Grim, R Druga. *Základy anatomie : 5. Anatomie krajín těla*. místo neznámé : Galén, 2008. ISBN 978-80-7262-179-8.
15. [Online] [Citace: 16. 7 2018.] https://is.muni.cz/el/1411/jaro2011/VSNV041p/13542700/14_Bazalni_ganglia.pdf.
16. L Eide, C T McMurray. Culture of adult mouse neurons. *BioTechniques*. 2005, 38, stránky 99-104.

17. D E Folkman, J A Ingber, J Madri. A Possible Mechanism for Inhibition of Angiogenesis by Angiostatic Steroids: Induction of Capillary Basement Membrane Dissolution. *Endocrinology*. 1986, 119, stránka 4.
18. BM Gubiner. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell*. 1996, 84, stránky 345-357. sekundární citace.
19. A Blau. Cell adhesion promotion strategies for signal transduction enhancement in microelectrode array in vitro electrophysiology: An introductory overview and critical discussion. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 2013, stránky 481-492. sekundární citace.
20. A Silva, J Pereira, CR Oliveira, JB Relvas, AC Rego. BDNF and extracellular matrix regulate differentiation of mice neurosphere-derived cells into a GABAergic neuronal phenotype. *Journal of Neuroscience Research*. 2009, 87, stránky 1986-1996.
21. S C Barros, S J Franco, U Müller. Extracellular Matrix: Functions in the Nervous System. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2011, 3, strana a005108.
22. A Hautanen, J Gailit, D M Mann, E Rouslahti. Effects of modifications of the RGD sequence and its context on recognition by the fibronectin receptor. *The Journal of biological chemistry*. 1989, 264, stránky 1437–1442.
23. W-M Zhang, J Kapyla, J S Puramen, C G Knight, C F Tiger, O T Pentikainen, M S Johnson, R W Farndale, J Heino, D Gullberg. $\alpha 11\beta 1$ integrin recognizes the GFOGER sequence in interstitial collagens. *The Journal of biological chemistry*. 2003, 9, stránky 7270–7277.
24. [Online] (e)
[http://nas.lf3.cuni.cz/materialy/CVSE1M0001/24%20extracecularni%20matrix,\(50852961cb115\).pdf](http://nas.lf3.cuni.cz/materialy/CVSE1M0001/24%20extracecularni%20matrix,(50852961cb115).pdf).
25. [Online] http://www.beckman.cz/Media/Default/Dokumenty/DNAXI-presentations/1230-Bacakova_tkanove_inzenyrstvi_Beckman%20s.pdf.
26. Beckman. [Online] www.beckman.cz/Media/Default/Dokumenty/DNAXI-presentations/1230-Bacakova_tkanove_inzenyrstvi_Beckman%20s.pdf.
27. B Alberts, A Johnson, J Lewis, et al. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. Garland Science, 2002. ISBN-10: 0-8153-3218-1
28. X Wu, D S Reddy. Integrins as receptor targets for neurological disorders. *Pharmacology & Therapeutics*. 2012, stránky 68-81. dostupné online
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2011.12.008>.
29. F G Giancotti, E Ruoslahti,. Integrin Signaling. *Science*. 1999, 285, strana 5430.
30. RCSB. [Online] [Citace: 28. 06 2018.] <https://www.rcsb.org/structure/1epf>.
31. [Online] [Citace: 28. 06 2018.] <http://www.pathologyoutlines.com/topic/cdmarkerscd56.html>.

32. S K Mistry, E W Keefer, B A Cunnigham, G M Edelman, K L Crossin. Cultured rat hippocampal neural progenitors generate spontaneously active neural networks. *pnas*. 2002, 99, 3, stránky 1621-1626.
33. M Takeichi. The cadherin superfamily in neuronal connections and interactions. *Nature Reviews Neuroscience*. 2007, 8, stránky 11-20. sekundární citace.
34. S F Cogan. Neural Stimulation and recording electrodes. *Annual review of biomedical engineering*. 2008, 10, stránky 275-309. sekundární citace.
35. G Piret, C Hebert, J-P Mazellier, L Rousseau, E Scorsone, M Cottance, G Lissorgues, M O Heuschkel, S Picaud, P Bergonzo, B Yvert. 3D-nanostructured boron-doped diamond for microelectrode array neural interfacing. *Biomaterials*. 2015, 53, stránky 173-183.
36. AC Taylor, B Vagaska, R Edgington, C Hébert, P Ferretti, P Bergonzo, RB Jackman. Biocompatibility of nanostructured boron doped diamond for the attachment and proliferation of human neural stem cells. *Journal of neural engineering*. 2015, 12, strana 066016.
37. D R Merrill, M Bikson, J G Jefferys. Electrical stimulation of excitable tissue: design of efficacious and safe protocols. *J. Neuroscience Methods*. 2005, 141, stránky 171-98.
38. B D Winslow, M B Christensen, W K Yang, F Solzbacher, P A Fresco. A comparison of the tissue response to chronically implanted Parylene-C-coated and uncoated planar silicon microelectrode arrays in rat cortex. *Biomaterials*. 2010, stránky 9163-9172.
39. P W May, E M Regan, A Taylor, J Uney, A D Dick, J McGeehan. Spatially controlling neuronal adhesion on CVD diamond. *Diamond and Related Materials*. 2012, stránky 100-104.
40. [Online] <http://cabellhuntington.org/services/neuroscience/deep-brain-stimulation/>.
41. Medtronic. [Online] [Citace: 13. 3 2018.] <https://www.medtronic.com/us-en/healthcare-professionals/products/neurological/deep-brain-stimulation-systems/activa-sc.html>.
42. [Online] <https://web.natur.cuni.cz/ugmnz/mineral/tvary.html>.
43. W G Gross, B K Rhoades, H M E Azzazy, M Wu. The use of neuronal networks on multielectrode arrays as biosensors. *Biosensors and bioelectronics*. 1995, stránky 553-567.
44. N Laube, L Kleinen, J Bradenahl, A Meissner. Diamond-like carbon coatings on ureteral stents – a new strategy for decreasing the formation of crystalline bacterial biofilms? *The Journal of urology*. 2007, 177, stránky 1923-7.
45. V N Mochalin, O Shenderova, D Ho, Y Gogotsi. Nature Nanotechnology. 2012, 18, stránky 11-23.
46. J Šlegerová, P Cígler. Nanodiamanty - Fluorescenční a zobrazovací nanosondy. *Chemické Listy*. 2014, 108, stránky 387-393. sekundární citace.
47. S M Ojovan, M McDonaal, N Rabieh, N Shmuel, H Erez, M Nesladek, M E Spira. Nanocrystalline diamond surfaces for adhesion and growth of primary neurons, conflicting results and rational explanation. *frontiers in neuroengineering*. 2014, 7.

48. O A Williams. Nanocrystalline diamond. *Diamond and Related Materials*. 2011, 20, stránky 621-640.
49. M Vaněček, J Kočka. CVD diamant a nanodiamant, aneb jak vzniká a co umí. *Technický týdeník*. 2005, str. 15.
50. F Fendrych, A Taylor, L Peksa, I Kratochvilova, J Vlcek, V Rezacova, V Petrak, Z Kluiber, L Fekete L, M Liehr. Growth and characterization of nanodiamond layers prepared using the plasma-enhanced linear antennas microwave CVD system. *Journal of Physics D: Applied Physics*. 2010, 43, stránky 374018-374026.
51. L Tang, C Tsai, W W Gerberich, L Kruckebein, D R Kania. Biocompatibility of chemical-vapour-deposited diamond. *Biomaterials*. 1995, 16, stránky 483-488.
52. [Online] [Citace: 17. 7 2018.] <http://www.mdpi.com/1424-8220/17/7/1686>.
53. P Ariano, O Budnyk, S Dalmazzo, D Lovisolo, C Manfredotti, P Rivolo, et al. On diamond surface properties and interactions with neurons. *The European physical journal. E, Soft matter*. 2009, 30, stránky 149-156.
54. E Vanhove, J de Sanoit, P Mailley, M-A Pinault, F Jomard, P Bergonzo. High reactivity and stability of diamond electrodes: The influence of the B-doping concentration. *Physical Status Solidi*. 2009, stránky 2063-9.
55. Ch G Specht, O A Williams, R B Jackman, R Schoepfer. Ordered growth of neurons on diamond. *Biomaterials*. 2003, 25, stránky 4073 - 4078.
56. L Bacakova, E Filova, M Parizek, T Ruml, V Svorcik. Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants. *Biotechnology Advances*. 2011, 29, stránky 739-767. sekundární citace.
57. H Sorribas, D Braun, L Leder, P Sonderegger, L Tiefenauer. Adhesion proteins for a tight neuron-electrode contact. *Journal of neuroscience methods*. 2001, 104, stránky 133-141.
58. A Voss, H Wei, C Müller, C Popov, W Kulisch, G Ceccone, C Ziegler, M Stengl, J P Reithmaier. Influence of the surface termination of ultrananocrystalline diamond/amorphous carbon composite films on their interaction with neurons. *Diamond & Related Materials*. 2012, 26, stránky 60-65.
59. [Online] [Citace: 7. 3 2018.] <https://www.med.cam.ac.uk/wp-content/uploads/2012/10/pi.pdf>.
60. [Online] [Citace: 16. 7 2018.] <https://www.abcam.com/neuroscience/neural-markers-guide>.
61. [Online] https://www.frontiersin.org/files/Articles/94788/fneng-07-00017-HTML/image_m/fneng-07-00017-g002.jpg.
62. P Ariano, A L Giudice, A Marcantoni, E Vittone, E Carbone, D Lovisolo. A diamond-based biosensor for the recording of neural activity. *Biosensors and bioelectronics*. 2008, 24, stránky 2046-2050.

63. M Bonnauron, S Saada, C Mer, C Gesset, O A Williams, L Rousseau, E Scorsone, P Mailley, M Nesladek, J-C Arnault, P Bergonzo. Transparent diamond-on-glass micro-electrode arrays for ex-vivo neuronal study. *Physica status solidi applications and materials science*. 2008, 9, stránky 2126-2129.
64. A Vaitkuvienė, M McDonald, F Vahidpour, J-P Noben, K Sanen, M Ameloot, V Ratautaite, V Kaseta, G Biziuleviciene, A Ramanaviciene, M Nesladek, A Ramanavicius. Impact of differently modified nanocrystalline diamond on the growth of neuroblastoma cells. *New Biotechnology*. 2015, 32, stránky 7-12.
65. M Amaral, P S Gomes, M A Lopes, J D Santos, R F Silva, M H Fernandes. Cytotoxicity evaluation of nanocrystalline diamond coatings by fibroblast cell cultures. *Acta Biomaterialia*. 2009, 5, stránky 755-763.
66. A Thalammer, R J Edington, L Cingolani, R Schoepfer, R B Jackman. The use of nanodiamond monolayer coatings to promote the formation of functional neuronal networks. *Biomaterials*. 2010, 31, stránky 2097-2104.
67. V Vermeeren, S Wenmackers, P Wagner, L Michiels. DNA Sensors with Diamond as a Promising Alternative Transducer Material. *Sensors*. 2009, 9, stránky 5600-5636.
68. YC Chen, DC Lee, CY Hsiao, YF Chung, HC Chen, JP Thoma, et al. The effect of ultra-nanocrystalline diamond films on the proliferation and differentiation of neural stem cells. *Biomaterials*. 2009, 30, stránky 3428-35.
69. A M Schrand, S A Ciftan Hens & O A Shenderova. Nanodiamond Particles: Properties and Perspectives for Bioapplications. *Critical Reviews in Solid State and Materials Sciences*. 2009, 34, stránky 18-74.
70. [Online] http://manuals.medtronic.com/content/dam/emanuals/neuro/CONTRIB_217935.pdf.
71. Daenen M., Zhang L., Erni R., Williams O. A., Hardy A., Van Bael M. K., et al. Diamond nucleation by carbon transport from buried nanodiamond TiO₂ sol-gel composites. *Advanced Materials*. 2009, 21, stránky 670-673.
72. A, Kreuger. Beyond the shine: recent progress in applications of nanodiamond. *Journal of materials chemistry*. 2011, stránky 12571-12578.
73. [Online] [Citace: 12. 3 2018.] <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/21103049>.
74. [Online] [Citace: 12. 3 2018.] <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/brands/gibco/gibco-b-27-supplement.html>.
75. Wikipedia. [Online] [Citace: 13. 3 2018.] https://cs.wikipedia.org/wiki/Hoechstovo_barvivo.
76. ThermoFisher scientific. [Online] [Citace: 13. 3 2018.] <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/V12883?SID=srch-srp-V12883>.
77. ThermoFisher SCIENTIFIC. [Online] [Citace: 13. 3 2018.] <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/V12883?SID=srch-srp-V12883>.

78. ThermoFisher SCIENTIFIC. [Online] [Citace: 13. 3 2018.]
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A12379>.
79. [Online] http://siret.ms.mff.cuni.cz/MFiLF/files/pres/hubalek_kalbacova_ncd.pdf.
80. [Online] <http://docs.abcam.com/pdf/neuroscience/neural-lineage-markers-web.pdf>.
81. Christopher S. Chen, Milan Mrksich, Sui Huang, George M. Whiteside, Donald E. Ingber. Geometric Control of Cell Life and Death. *Science*. 1997, 276, stránky 1425-8.
82. [Online] [Citace: 16. 7 2018.]
<https://is.muni.cz/el/1431/podzim2009/Bi7070/Celljunctioncelladhesion.txt>.
83. A C Ferrari, J Robertson. Raman spectroscopy of amorphous, nanostructured, diamond-like carbon, and nanodiamond. *Philosophical transactions of the royal society a mathematical, physical and engineering sciences*. 2004, 362, stránky 2477-2512.
84. W P May. Diamond thin films: a 21st-century material. *Philosophical transactions of the royal society a mathematical, physical and engineering sciences*. 2000, 258, stránky 473-495. sekundární citace.
85. L C Smith-Thomas, J Stevens, J Fok-Seang, A Faissner, J H Rogers, J W Fawcett. Increased axon regeneration in astrocytes grown in the presence of proteoglycan synthesis inhibitors. *Journal of Cell Science*. 1995, 108, stránky 1307-1315.